

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie



MARIE ŘADOVÁ

**Stanovení sekvenčních variací mtDNA v české populaci pro využití ve
forenzí genetice**

Determination of mtDNA sequence variation in Czech population
for the usage in forensic genetics

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Pavla Coufalová

Praha 2011

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své školitelce Mgr. Pavle Coufalové za odborné rady, trpělivost a přátelský přístup.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 5. 5. 2011

.....
Marie Řadová

Obsah:

1. Úvod	6
1.2 Mitochondriální DNA v buňce	6
1.3 Historie DNA profilování	7
2. Porovnání metod DNA analýzy	8
3. Proces genetické analýzy v oblasti forenzního zkoumání	9
3.1 Zajištění biologického materiálu	9
3.2 Extrakce DNA z buněk	9
3.2.1 Fenol-chloroformová extrakce	9
3.2.2 Extrakce Chelexem	10
3.2.3 Adsorpce na silikát	10
3.3 Kvantifikace DNA	10
3.3.1 PCR – polymerázová řetězová reakce	11
3.4 Sekvenování DNA	12
3.5 Detekce	13
4. Mitochondriální DNA	13
4.1 Význam mtDNA	13
4.2 Struktura mtDNA	14
4.2.1 Porovnání jaderné a mitochondriální DNA	15
4.2.2 Záznam rozdílů oproti revidované Cambridžské sekvenci	15
4.2.3 Heteroplasmie	16
4.3 Využití mitochondriální DNA	17
4.3.1 Identifikace různých biologických druhů	17
5. Analýza mtDNA	18
5.1 Historie sekvenování mtDNA	18
5.2 Interpretace výsledků	19
5.2.1 C-úseky	19
6. Populační databáze	20
6.1 Populační databáze ve světě	21
6.2 Populační databáze v České republice	23
7. Vlastní práce – analýza mtDNA a vytvoření populační databáze	24
7.1 Materiály a metodika	24
7.2 Výsledky	25
8. Závěr	29
9. Použité zkratky	31
10. Použitá literatura	32

Abstrakt

Ve forenzním výzkumu i praxi se běžně setkáváme s analýzou jaderné DNA. V některých případech je ovšem dostupná pouze DNA mitochondriální. MtDNA se nachází v buňkách člověka, na rozdíl od jaderné DNA, v průměru v 500 kopiích. Je dědičná pouze po maternální linii, takže se zachovává po generaci nezměněná, až na specifické nekódující úseky, kde se často vyskytují mutace. Určení specifického haplotypu pomáhá kriminalistům k identifikaci neznámého vzorku, kde maternální příbuzní mohou poskytnout referenční vzorky pro porovnání. MtDNA je také oproti jaderné DNA velmi odolná vůči vnějším vlivům, čehož se ve forenzní genetice velmi často využívá v případech, kdy je zkoumaného materiálu velmi málo či je degradovaný. Abychom mohli s určitou pravděpodobností vyloučit nebo potvrdit shodu dvou vzorků nebo zařadit podezřelého či pohřešovaného do specifické populace, z které hledaná osoba pochází, potřebujeme dostatečně velké srovnání. Tím jsou pro nás právě populační databáze mitochondriální DNA, na kterých studujeme frekvence výskytu různých haplotypů v jednotlivých populacích. V této práci se zabývám historií DNA sekvenování v oblasti forenzního zkoumání, mitochondriální DNA analýzou a také srovnáním dat dostupných v populačních databázích ve světě i v České republice. Práci jsem dále doplnila analýzou dvou hypervariabilních úseků HV1 a HV2 138 nepříbuzných jedinců z České republiky u kterých jsem určila jednotlivé haploskupiny i haplotypy a stanovila přibližné zastoupení v západoevropské společnosti ve srovnání s ostatními publikovanými daty.

Klíčová slova

Mitochondriální DNA, populační databáze mtDNA, HV1, HV2, haplotyp, haploskupina, sekvenování mtDNA

Abstract

In forensic research and practice is used an analysis of nuclear DNA commonly. However, in some cases we can use only mitochondrial DNA. The mtDNA is maternally inherited and it is located in the each cell approximately in 500 copies. Barring mutation in special noncoding segments, the mtDNA sequence of siblings and all maternal relatives is identical. This unique haplotyp can be helpful in forensic cases, such as analyzing the remains of a missing person, where known maternal relatives can provide reference samples for direct comparison to the questioned mtDNA type. MtDNA is also very resistant to the external influences, so in the cases where the amount of extracted DNA is very small or degraded it is more likely that a DNA typing result can be obtained by typing mtDNA than by typing polymorphic markers found in nuclear DNA. If we want to have a certain probability to exclude or confirm the match of two samples, classify suspect or missing person into a population, we need some enough wide comparison by the population databases. Then we can study the frequencies of different haplotypes in particular population. The aim of this thesis is summery of history of DNA analysis, mtDNA sequencing and comparison of data available in published databases in the world and mainly in the Czech Republic. There is also added an analysis of two hypervariable segments (HV1 and HV2) in 138 unrelated individuals. This sequence comparison led to the identification of particular haplogroups and frequencies in the Czech population.

Key words

Mitochondrial DNA, mtDNA population databases, HV1, HV2, haplotype, haplogroup, mtDNA sequencing

1. Úvod

Díky novým postupům v oblasti analýzy DNA se za posledních dvacet let podařilo objasnit mnoho do té doby nevyřešitelných případů. Forenzní genetika využívá různé metody analýzy DNA nejčastěji při vyšetřování trestných činů. Je také nepostradatelná pro určení otcovství nebo při identifikaci ostatků zemřelých.

Forenzní genetika se zabývá zkoumáním biologických stop nalezených na místě činu, nebo v souvislosti s trestným činem, za účelem zjistit původce stop. Má své uplatnění i v oborech, které přímo nesouvisejí s trestním řízením. Jsou to obory jako biomolekulární archeologie a paleogenetika, genogenealogie, zabývající se pátráním po předcích a vzdálených příbuzných, nebo genogeografie, obor zabývající se pátráním po evolučně geografickém původu. Forenzní genetika se však netýká pouze lidí, ale také jiných organismů jako jsou rostliny, ostatní eukaryota i prokaryota. Podstatou forenzní genetiky je především rozeznání DNA jedince od DNA ostatních.

V této práci se budu zabývat právě aktuálními metodami forenzního DNA výzkumu a jeho využitím v praxi, zaměřím se hlavně na mitochondriální DNA, mtDNA analýzu a populační databáze. Práci doplním i praktickou částí, v níž se budu snažit vytvořit databázi mitochondriální DNA, která by mohla sloužit k dalším forenzním účelům.

1.2 Mitochondriální DNA v buňce

Je všeobecně známo, že každá lidská buňka obsahuje 22 párů autozomálních chromozomů a jeden pár gonozomálních – XX nebo XY, ale méně lidí už ví, že každá naše buňka v sobě má také v průměru okolo pěti set malých kružnicových mitochondriálních DNA (Satoh a Kuroiwa 1991).

Jaderná DNA dohromady zahrnuje přes tři miliardy párů bází, zatímco mitochondriální pouze 16 568 párů bází. Všechny geny dohromady však tvoří pouze 3 % celkového lidského genomu. Nekódující DNA je někdy nazývána jako „junk“ DNA. Ovšem i tato junk DNA (v překladu doslova haraburdí), může hrát svoji podstatnou roli. Markery, které jsou využívány při identifikaci, leží častěji v nekódující oblasti, tedy v intronech, než uvnitř genů nebo mezi nimi.

DNA je v každém jádře buňky, a proto je také přítomna v biologických stopách ponechaných na místě činu. Jaderná DNA již byla úspěšně izolovaná a analyzovaná z nejrůznějších druhů biologického materiálu. Dnes můžeme díky PCR vytvořit mnoho kopií úseků DNA, které chceme zkoumat. Nejčastěji analyzované biologické materiály jsou krev, sliny a sperma nebo skvrny z nich. Dále pak kosti, zuby, vlasy, moč, výkaly, nečistoty

z nehtů, svalová tkáň, nedopalky cigaret, žvýkačky, poštovní známky, obálky, lupy a otisky prstů. Všechny tyto biologické stopy mohou sloužit jako důkazní materiál. (Butler 2005)

1.3 Historie DNA profilování

Kolem roku 1900 objevili Karl Landsteiner a Jan Jánský systém krevních skupin AB0, což můžeme považovat za základ zkoumání lidské identifikace. DNA profilování, tak jak je dnes známo, bylo poprvé popsáno anglickým genetikem Alecem Jeffreysem v roce 1985 (Jeffreys 1985). Alec Jeffreys tehdy objevil určité oblasti DNA, které se za sebou znovu a znovu opakují. Objevil také, že počet těchto oblastí se liší od jedince k jedinci a označil tento jev hovorovým termínem genetic fingerprint – „genetický otisk prstu“. (Jeffreys 1986)

Tyto repetitivní oblasti jsou dnes známy jako VNTR (variabilní počet tandemových repetice) nebo také minisatelity. Technika používaná Dr. Jeffreysem k výzkumu minisatelitů se nazývá RFLP (délkový polymorfismus restrikčních fragmentů) neboli restrikční analýza, která vyžaduje použití restrikčních enzymů ke štěpení DNA na fragmenty. (Rapley a Whitehouse *et al.* 2007)

Poprvé se genetických metod doktora Jeffreyse využilo k vyřešení případů vraždy a znásilnění dvou mladých dívek, které se staly v roce 1983 a 1986 v Anglii v blízkosti vesnice Narborough. Oba případy měly společné rysy provedení, vedly však k podezřelému, který měl shodnou pouze krevní skupinu nalezenou na obětech (tato krevní skupina se ovšem nachází u 10 % populace). Na základě genetické analýzy provedené právě Alecem Jeffreysem a jeho spolupracovníky se podezřelý shledal nevinným. Byl to první člověk, který byl díky genetické analýze zproštěn obvinění.

V souvislosti s tímto případem bylo policií odebráno více než 4500 vzorků krve mužů z okolních vesnic. Vrah se však mezi nimi opět nenašel. Až o rok později vypověděla žena, která v baru náhodou zaslechla, jak se nějaký muž chlubí tím, že poskytl vzorek krve příteli Colinu Pitchforkovi. Policie tohoto muže vypátrala a díky genetické analýze obvinila ze spáchání obou trestných činů. V roce 1988 byl C. Pitchfork odsouzen k doživotnímu trestu. (Butler 2005, <http://www.forensic.gov.uk/html/media/case-studies/f-18.html>)

V České republice byl díky genetické analýze jako první obžalován ze spáchání brutální vraždy studentky v roce 1990 Milan Lubas. Za posledních dvacet let se testy identifikace rozšířily do celého světa. Analýza DNA je dnes rychlejší, citlivější i levnější a stačí k ní pouze velmi malé množství DNA.

2. Porovnání metod DNA analýzy

Různé druhy metod analýzy DNA se liší především tím, jak dobře dokážou odlišit dva jedince a také tím, jak rychle tyto výsledky získáme. Rychlost DNA analýzy se za posledních dvacet let dramaticky zvýšila. To, co kdysi trvalo 6 až 8 týdnů, dnes zabere pár hodin.

Dříve se k identifikaci pachatele používalo pouze rozlišení díky systému AB0 krevních skupin. Ty jsou ale pouze čtyři – A, B, AB a 0, s tím, že 0 je u 40 % populace.

V minulosti se k testům identity používala také jedno či multilokusová restrikční analýza (multi/single locus RFLP), dnes zejména různé metody založené na PCR.

Restrikční analýza MLPs (multi-locus probes) má vysokou rozlišovací schopnost, ale vyžaduje k vytvoření DNA profilů hodně času, velké množství vzorků a není plně automatizovaná. Proto většinou laboratoře prováděly restrikční analýzu jednolokusovou (single-locus RFLP) a tím pádem několikrát. Přesto si tato metoda našla své využití v testech otcovství. (Rapley a Whitehouse *et al.* 2007)

Jedním z nejlepších řešení se stala analýza pomocí STR markerů neboli mikrosatelitů. Testy pomocí STR (Short Tandem Repeats) jsou rychlé, protože jak je již z názvu patrné, jsou úseky zkoumání krátké, což umožňuje analyzovat tři i více úseků najednou. Jednotlivé STR testy se mohou provádět samostatně nebo v komplexu. Komplexní STR testy jsou užitečnější, jelikož mohou produkovat velmi přesné výsledky. S jejich pomocí lze úspěšně vyhodnotit i vzorek směsi biologického materiálu nebo molekuly degradované DNA. Komplexní analýza STR může být navíc plně automatizována. (Kimpton *et al.* 1993)

Dále se ve forenzní genetice využívá také SNP markerů, tedy jednonukleotidových polymorfismů 1 či 2 nukleotidové), které se nacházejí v DNA každého jedince. Výhodou SNP na rozdíl od STR markerů je jejich malá velikost, což hraje roli jak při PCR tak i při další analýze. Nevýhodou SNP markerů je to, že není možné získat výsledky z malého množství DNA. Dnes se SNP analýza provádí často s použitím biočipů.

Stále populárnější se stává také analýza chromozómu Y, přesněji STR markerů na chromozómu Y. Je zcela zřejmé, že se tato metoda může týkat pouze mužské části populace.

Mitochondriální DNA analýza, na kterou bych se v této práci chtěla zaměřit, neumožňuje na rozdíl od jiných metod individuální identifikaci. Podobně jako analýza chromozómu Y slouží pouze k určení skupinové příslušnosti. Analýza mtDNA vyžaduje náročnější metodiku vyhodnocování dat, ale přesto může být velmi užitečná ve forenzním vyšetřování. Při vyšetřování se nezdá, kdy setkáváme se vzorky vysoce degradované DNA, a mtDNA má tu výhodu, že je v buňkách obsažena přibližně v 500 kopiích, tudíž je většinou lépe zachována. (Budowle 2003)

3. Proces genetické analýzy v oblasti forenzního zkoumání

3.1 Zajištění biologického materiálu

Různé typy biologických stop mohou vyloučit nebo potvrdit účast na zločinu. Biologický materiál podezřelého se většinou nachází na těle nebo oblečení oběti, na nějakých předmětech či místech. Shromažďování DNA z místa činu musí být proto provedeno velice pečlivě. Následují totiž metody vedoucí k vytvoření profilů DNA, které budou sloužit jako důkazní materiály. Metody analýzy DNA se staly tak citlivými, že biologické stopy obsahující pouze 100 pg DNA lze použít k propojení s podezřelým (Morling 2009). Tyto důkazy musí být shromážděny, skladovány a přepravovány s největší mírou pečlivosti.

Sběr vzorků vyžaduje přesná pravidla zabráňující jeho kontaminaci nebo degradaci. K uchování vzorků se používají prodyšné materiály, aby případná voda obsažená ve vzorku nezpůsobila zplesnivění a degradaci. K odběrům DNA, které budou sloužit jako srovnávací vzorky, se častěji než odběr krve provádí bukalní stěr – za použití tyčinky s vatou, kterou se vytře tvář. U dětí se může použít i kartáček na zuby.

V laboratoři jsou DNA vzorky uloženy v chladničce při 4 °C nebo mrazničce při -20 °C. Extrahované DNA vzorky, které potřebujeme zachovat po dlouhou dobu, jsou skladovány při teplotě -70 °C. Předjde se tak nukleázovým aktivitám, které by mohly degradovat DNA. (Butler 2005)

3.2 Extrakce DNA z buněk

Extrakce DNA lze provádět několika metodami dle druhu biologického materiálu – organickou, metodou Chelex, ale nejčastěji adsorpcí na silikát. Následuje kvantifikace DNA a dále PCR – polymerázová řetězová reakce.

3.2.1 Fenol-chloroformová extrakce

Organická neboli fenol-chloroformová metoda extrakce odstraňuje ostatní proteiny od DNA rozpuštěné ve vodném prostředí. Nejprve se do roztoku přidá proteinkináza K a SDS (dodecyl sulfát sodný), aby se rozrušily buněčné stěny a proteiny, které chrání nukleotidová vlákna v chromozomech. Extrakce zahrnuje přidání směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Chloroform se nemísí s vodným roztokem s obsahem DNA, ale při protřepání těchto částí může srážet proteiny přítomné ve vodné složce. Po centrifugaci se na rozhraní těchto dvou částí objevuje bílý prstenec sražených proteinů. Horní vodnou vrstvu s obsahem DNA opatrně přenášíme do nové zkumavky pro další analýzu. To však může nést riziko kontaminace, metoda je také časově náročnější. (Köchl *et al.* 2005)

3.2.2 Extrakce Chelexem

Alternativní metodou je extrakce Chelexem. Chelex je speciální pryskyřice, která váže ionty hořčíku a může být přidána přímo do zkumavky se vzorkem DNA. Navázáním hořčíku inaktivuje Chelex různé nukleázy, které mohou poškodit DNA.

Většinou je přidávána 5% suspenze Chelexu a DNA je po několik minut denaturována při 100 °C. Po centrifugaci je ze zkumavky vyjmut supernatant, ve kterém je jednovláknová DNA, zatímco Chelex zůstává na dně.

U této metody je výhodné to, že po jejím provedení můžeme postoupit rovnou k PCR a hrozí tak menší riziko kontaminace. Nelze ji ovšem použít pro silně znečištěný vzorek. Tato metoda také neodstraňuje inhibitory. Extrahovaná DNA je v roztoku ve formě rozvolněných vláken, proto také nemůže být použita k analýze pomocí RFLP (Walsh *et al.* 1991).

3.2.3 Adsorpce na silikát

Dnes se používá zejména metoda extrakce DNA pomocí silikátu. Nejčastěji se uplatňují produkty firmy Qiagen, např. QIAamp DNA Mini Kit (Greenspoon *et al.* 1998). Metoda je založena na tom, že v prostředí chaotropních solí DNA adsorbuje na silikátové částice (membránu). Nečistoty a případné inhibitory zůstávají v roztoku a lze je pak jednoduše odstranit – částice s adsorbovanou DNA necháme usadit nebo usazení urychlíme centrifugou, odsajeme supernatant obsahující nežádoucí látky a promyjeme novou dávkou pufru s chaotropními solemi. Po opětovném odstředění a odsátí roztoku zůstává na částicích čistá DNA. Tu lze pak z povrchu částic snadno uvolnit přidáním vody nebo vhodného pufru, který neobsahuje chaotropní soli. Po odstředění zůstanou na dně jen samotné částice, nad nimi je čistý roztok DNA.

3.3 Kvantifikace DNA

Kvantifikaci DNA určíme množství a čistotu extrahované DNA. K tomuto účelu lze použít metody jako real-time PCR, kolorimetrie, dot-blot, spektrofotometrie nebo radiografie. Z důvodů nároků na vysokou citlivost, přesnost a malou spotřebu vzorků je ve forenzní genetice výhradně využívána real-time PCR.

Real-time PCR je založena na sledování průběhu polymerázové řetězové reakce (PCR) přímo během reakce pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Amplifikace i detekce příslušného úseku DNA probíhá současně a přístroj umožňuje sledování průběhu reakce přímo na monitoru počítače. Výstupem je tedy také záznam fluorescence v každém cyklu

PCR, k tomu se používají fluorescenční barviva jako např. SYBR Green či ethidium bromid, nebo sonda TaqMan. Kvantifikace se provádí prostřednictvím matematické analýzy amplifikačních křivek vzniklých vynesemím naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu. (Rapley a Whitehouse *et al.* 2007)

Pomocí firemních kvantitativních kitů užívaných ve forenzní genetice je specificky určena koncentrace lidské DNA a zároveň tyto kity umožňují odhalit přítomnost inhibitorů díky vnitřní pozitivní kontrole.

3.3.1 PCR – polymerázová řetězová reakce

Real-time PCR je samozřejmě založena na principu klasické PCR, proto bych zde chtěla stručně shrnout tento základní molekulární proces.

PCR, kterou objevil v roce 1986 Karl Mullis, je enzymatický proces, během kterého se replikuje specifická sekvence DNA stále znovu, takže získáme mnoho kopií určité sekvence (Mullis *et al.* 1986).

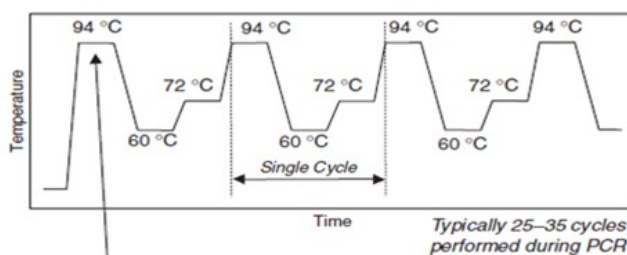
Tento molekulární kopírovací proces vyžaduje kolem 30 termálních cyklů zahřívání a ochlazování vzorků. Produkty reakce jsou definovány oligonukleotidovými primery, které jsou komplementární k 3' konci konkrétní sekvence.

Proces probíhá v termálních cyklech a vyžaduje obvykle tři různé teploty, které se opakují 25–35 krát během tří hodin, každý cyklus tedy trvá asi pět minut. Komponenty PCR jsou někdy obsaženy v komerčních kitech.

Nejdůležitější součásti jsou dva primery, polymeráza, nejčastěji polymeráza Taq, která pochází z bakterie *Thermus aquaticus*. Dále templát, který bude kopírovaný, chlorid hořečnatý, KCl, pufr, deoxynukleotid trifosfát (dNTPs), sérový albumin a voda.

PCR sestává z několika kroků:

- Denaturace – DNA se zahřívá na teplotu 94–98 °C, tudíž dochází k rozvolnění dvoušroubovice. Vzniká tak jednovláknová DNA, na kterou poté mohou nasednout primery.
- Nasednutí primerů – při teplotě 50–65 °C mohou primery nasednout na specifická místa DNA. Na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže DNA polymeráza.



Obr 1. Průběh polymerázové řetězové reakce.
Butler, Forensic DNA Typing 2005

- Prodlužování primerů – Při teplotě 72 °C (pro polymerázu Taq) dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce k 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA.

Při amplifikaci STR či SNP se ve forenzní genetice často využívá také multiplexní PCR, díky níž můžeme amplifikovat dvě i více oblastí DNA najednou.

3.4 Sekvenování DNA

Sekvenování DNA se provádí zejména na základě tzv. Sangerovy metody (název podle objevitele), která byla poprvé popsána skoro před více než třiceti lety (Sanger *et al.* 1977). Základem této metody je začlenění dideoxynukleotidů do DNA řetězce a seřazení oligonukleotidů následnou elektroforézou.

Dideoxynukleotidy, které jsou přítomné v reakční směsi spolu s deoxynukleotidy (v poměru 1:100), se začleňují do replikující se DNA, a zastaví tak elongaci řetězce. Tím vznikne mnoho oligonukleotidů končících jedním typem báze (provádí se čtyři druhy reakcí – pro každý typ nukleotidu zvlášť). Ty se pak následně ve čtyřech elektroforetických gelech seřadí podle délky, a tak můžeme zjistit jaké je pořadí bází v řetězci.

V současné době se při sekvenování téměř výhradně používají automatické sekvenátory, které velmi urychlily celý proces. Děj totiž probíhá pouze v jedné reakci. Využívá se zde dideoxynukleotidů, které jsou značeny fluorescenčními barvivy. Fluorescenční signál je potom softwarem znázorněn různými barvami. Následná kapilární elektroforéza pak stanoví pořadí nukleotidů v DNA. Sekvenování se provádí v obou směrech, takže se později mohou porovnat výsledky z obou komplementárních vláken. (Butler 2005)

Tato technologie, která si získala i Nobelovu cenu, se stále používá, ale známe už také nové metody jako je například pyrosekvenování. To nám totiž umožňuje přesně vyčíslit, kolik mtDNA obsahuje náš vzorek (Andréasson *et al.* 2006). Další alternativou pak může být minisekvenování, které umožňuje najednou rozpoznat deset krátkých a dva dlouhé polymorfismy v hlavní nekódující oblasti mtDNA. (Morley *et al.* 1999)

3.5 Detekce

Výsledné produkty jsou separovány elektroforézou v gelu nebo kapilární elektroforézou. To je metoda založená na různé hmotnosti nabitých částic. Delší molekuly se pohybují směrem k anodě pomaleji než kratší. Kapilární elektroforéza má tu výhodu, že všechny její kroky mohou být plně automatizovány a spotřebuje se jen velmi přesné a malé množství vzorku.

Cílem forenzně genetického zkoumání je stanovení profilu DNA polymorfismů, případně sekvence DNA analyzovaného vzorku. K tomu jsou samozřejmě využívány nejrůznější softwary. Určené profily DNA nebo sekvence jsou následně porovnávány se srovnávacími vzorky např. podezřelých osob. V případě shody je třeba určit, s jakou pravděpodobností bude mít náhodně vybraný jedinec identický genotyp s naším vzorkem. V případě neshody lze vyloučit, že původcem biologického materiálu v porovnávaných vzorcích je jedna a táž osoba. Při určování otcovství je profil DNA dítěte porovnáván s matčíným a s otcovským profilem DNA a s jiným, údajně možným, otcem.

Forenzní DNA analýzy jsou užitečné nejen pro zjišťování viny, ale stejně tak k ochraně nevinných. (Butler 2005)

4. Mitochondriální DNA

4.1 Význam mtDNA

Endosymbióza je jednou z hypotéz, jak mohla v buňce vzniknout mitochondriální DNA (Embley a Martin 2006). Podle jiné hypotézy byly mitochondrie bakterie integrované do větší bakterie, které spotřebovávaly H₂ vyrobený pohlčenou bakterií (Gray *et al.* 1999). To by mohlo vysvětlovat, proč se v buňkách nachází jaderná i mitochondriální DNA.

U poškozených nebo starých buněk, kde je jaderná DNA příliš degradovaná, lze pro forenzní genetiku využít právě mitochondriální DNA. Pravděpodobnost lepších výsledků než z jaderné DNA je především v případech, kdy je genetického materiálu velmi málo, například z kostí, zubů nebo vlasů. Pokud jsou pozůstatky staré, tak většinou nemáme k dispozici ani nic jiného.

Proč je právě mitochondriální DNA i ve velmi degradovaných buňkách? Hlavním hlediskem je to, že se v buňkách nachází několik desítek až stovek mitochondrií. Je zajímavé, že tyto organely mohou dokonce fúzovat a oddělovat se, a vytvářet tak složité funkční sítě (Hayashi *et al.* 1994). Množství mtDNA v buňce se může hodně lišit. Obvykle je v mitochondrii asi 4–5 kopií mtDNA, přitom každá buňka může obsahovat až stovky mitochondrií (Robin a Wong 1988). To by znamenalo, že v každé buňce se nachází tisíce kopií mtDNA, v průměru se ovšem jejich počet odhaduje ve většině buněk okolo 500 (Satoh a Kuroiwa 1991).

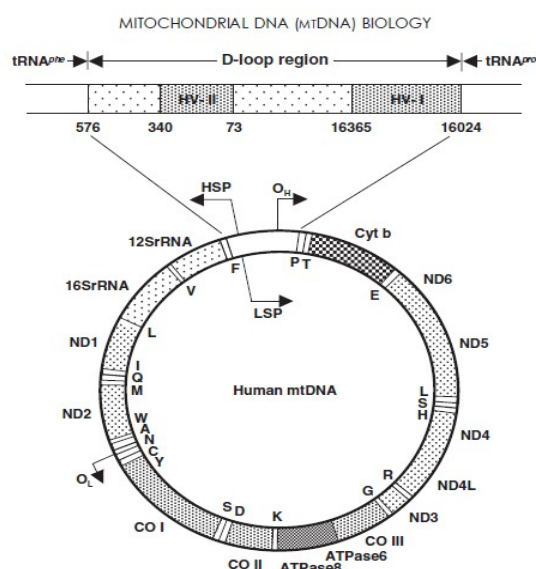
Mitochondriální DNA je na rozdíl od jaderné DNA děděna pouze od matky (Giles *et al.* 1980). Je to proto, že vajíčku se nachází přinejmenším sto tisíc mitochondrií a spermie jich vnese do zárodku při oplození jen několik desítek, ty jsou poměrně záhy zničeny.

4.2 Struktura mtDNA

V mtDNA je také 1122 párů bazí dlouhá kontrolní sekvence neboli D-smyčka. Ta obsahuje replikační počátek pro jedno z vláken mtDNA, ale nekóduje žádné genové produkty. Obsahuje však hypervariabilní segmenty HV1 (16024–16365), HV2 (73–340), a také HV3 (438–574). Výskyt mutací v HV1 a HV2 úseku je 5–10krát vyšší než v jaderné DNA. Na rozdíl od kódující oblasti mohou být na D-smyčce rozdíly mezi různými jedinci, protože není dále překládána a neobsahuje geny nutné k přežití buňky.

Číslování nukleotidů začíná zhruba uprostřed kontrolní sekvence, tedy číslem 1, a pokračuje ve směru 5' – 3', a protože je mtDNA kruhová, poslední nukleotid 16569 leží vedle prvního. (Taanman 1999)

Mitochondriální genom byl již celý osekvenován. Na základě rozdílů v hustotě jsou pojmenována vlákna jako těžká (heavy – H-vlákna) a lehká (light – L- vlákna). H-vlákna jsou bohatá na puriny (A, G), zatímco na L-vlákně dominují pyrimidiny (T, C). Replikace mtDNA začíná na H-vlákně v kontrolní oblasti. Z H-vlákna je celkově přepisováno 28 genů, na L-vlákně se transkribuje osm tRNÁs a enzym ND6.



*Obr 2. Schéma mitochondriální DNA
Rapley a Whitehouse 2007*

V mitochondriální DNA je také méně opravných mechanismů, což vede k většímu výskytu mutací i během replikace. Přesnost mtDNA polymerázy je totiž nižší, mtDNA chybí ochranné histonové proteiny. Průměrně se běloši mezi sebou liší v osmi nukleotidech, afroameričané pak v 15. (Budowle *et al.* 2003)

4.2.1 Porovnání jaderné a mitochondriální DNA

Tabulka 1. Rozdíly mezi jadernou a mitochondriální DNA. Butler, *Forensic DNA Typing* 2005.

Charakteristika	Jaderná DNA	Mitochondriální DNA
Velikost genomu	3.2 miliard párů bází	16568 párů bází
Kopie na buňku	2 (jedna kopie od každého rodiče)	cca 500
Procento celkové DNA na buňku	99.75	0.25
Struktura	lineární, chromozómy	kruhová
Dědičná po	matce i otci	matce
Chromozomální párování	diploidní	haploidní
Rekombinace	ano	ne
Replikační opravy	ano	ne
Unikátní	Unikátní (kromě jednovaječných dvojčat)	ne – stejná jako matčina
Výskyt mutací	nízký	5–10 krát více než u jaderné

Mitochondriální DNA používá také jiný genetický kód než jaderná DNA. Například, kodon pro mitochondriální transkripci aminokyseliny tryptofan je UGA, zatímco univerzální (jaderný) kód pro UGA je stop kodon. Výskyt mutací na mtDNA také zřejmě hraje roli v lidském stárnutí (Michikawa *et al.* 1999). Kruhový charakter mtDNA činí méně citlivou k exonukleázám, a odolnější je také protože je uložena v dvoumembránové molekule.

4.2.2. Záznam rozdílů oproti revidované Cambridžské sekvenci

Pro účely dalšího zpracování výsledku mtDNA analýzy jsou sekvence zaznamenávány v minimálním formátu, jen jako rozdíly oproti Cambridžské referenční sekvenci (CRS). Například liší-li se sekvence na pozici 16093 a 16129 budou zapsány ve formátu 16093C a 16129A, zbytek nukleotidů je považován za identický s rCRS. Báze, které nemohou být

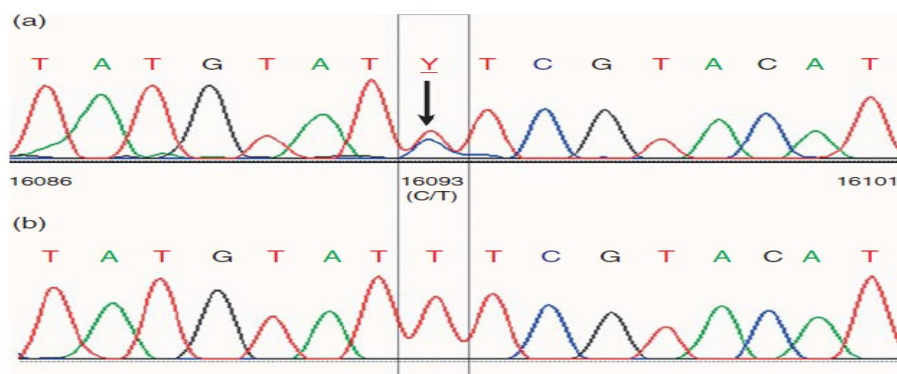
jednoznačně určeny, jsou označovány písmenem N. V pozicích jednoznačné dvojsmyslnosti (např. heteroplasmie), by se mělo užívat A/G = R a C/T= Y apod. (SWGDAM 2003)

Inzerce je popsána bezprostředně před inzercí tečkou a číslem 1 pro jednu inzerci, č. 2 pro druhou apod., poté následuje nukleotid těsně za inzercí. Např. 315.1C znamená, že je přítomno 5 cytosinů na pozici 311–315 a inzerce C (.1C) před pozicí 316. Delece je zaznamenávána jako pomlčka nebo D/d/del a následující nukleotidová pozice. (Butler 2005)

4.2.3 Heteroplasmie

Heteroplasmie je přítomnost více než jednoho typu mtDNA jednoho jedince. V literatuře se setkáváme s názorem, že v podstatě každý jedinec je na určitém stupni heteroplasmie (Comas *et al.* 1995, Tully *et al.* 2000). Heteroplasmie se běžně pozná podle přítomnosti dvou nukleotidů na jednom místě řetězce DNA, což ukazuje překrývání maxim v sekvenci na elektroferogramu (viz. obr. 3.)

Heteroplasmie je právě jedna z nevýhod používání mtDNA při identifikaci, protože může vést k chybnému vyloučení. Nicméně v jiných případech může heteroplasmie také zvýšit sílu shody, pakliže je přítomna v obou vzorcích.



Obr. 3. Butler, Forensic DNA Typing 2005

Heteroplasmie na dvou místech u stejného jedince byla popsána jako triplasmie (Tully *et al.* 2000), ale objevuje se v nižších frekvencích. Heteroplasmie se může vyskytovat v různých tkáních různě často, například ze vzorku krve heteroplasmie není stanovena, ale ve vzorcích vlasů též osoby může být přítomna. To je zřejmě způsobeno genetickým driftem a efektem hrdla láhve u dědičnosti vlasových folikulů (Budowle *et al.* 2003).

4.3 Využití mitochondriální DNA

Variabilita mitochondriální DNA je studována i v mnoha jiných oborech než je forenzní výzkum. V lékařském výzkumu spojují mitochondrie s mnoha dědičnými nemocemi. Evoluční biologové zkoumají lidskou DNA a porovnávají ji s mtDNA ostatních živočichů ve snaze zjistit vztahy mezi nimi. Dobrým příkladem tohoto použití je objev, že Neandrtálci nejsou přímými předky moderního člověka – na základě sekvencí kontrolní oblasti z nálezů pravěkých kostí (Krings *et al.* 1997).

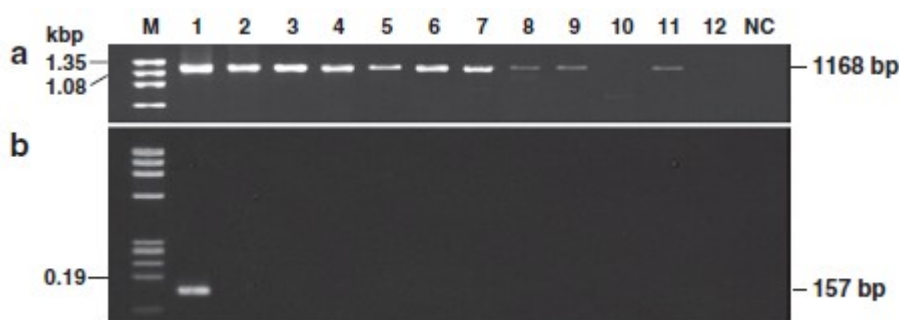
Molekulární antropologové studují rozdíly mezi mtDNA sekvencí z různých populací. Zkoumají otázky původu a migrace v průběhu historie (Relethford 2003). Prostřednictvím mtDNA můžeme také určit původ starých pozůstatků. Díky mtDNA se mohl analyzovat 7000 let starý mozek (Pääbo *et al.* 1988), nebo zjistit z pozůstatků chlapce, který zahynul při nehodě lodi Titanic v roce 1912, jeho totožnost.

Aby byla provedena identifikace tohoto chlapce, byly ostatky v roce 2001 exhumovány. To však přineslo jen čtyři kosterní pozůstatky, a to jednu 6 cm kost a tři zuby (Titley *et al.* 2004). Díky mtDNA analýze byl vytvořen profil HV1 oblasti kosti a dentinu a nakonec bylo opravdu možné určit s vysokou pravděpodobností identitu chlapce (Just *et al.* 2010).

4.3.1 Identifikace různých biologických druhů

Vzorky mtDNA nemusí být vždy lidského původu. To obvykle nepředstavuje problém, protože sekvenování HV1/HV2 oblastí zahrnuje nejen identifikaci jedince, ale i určení, zda jde o mtDNA lidskou či ne. Pokud selže amplifikace HV segmentů, je dobré zjistit, jestli důvodem není právě to, že tato mtDNA není lidského původu. K tomu můžeme využít toho, že mtDNA obsahuje geny pro cytochrom b. Cytochrom b (cyt b) je komponentou membránového proteinu, který se podílí na fungování dýchacího řetězce. Nachází se u mnoha druhů, včetně rostlin a zvířat, ale je druhově specifický, a proto je používán k určování druhů ve fylogenetických a forenzních šetřeních (Parson *et al.* 2000). Během těchto šetření je část genu cyt b amplifikována použitím univerzálních primerů a potom sekvenována.

Matsuda a kolektiv vyvinuli metodu založenou na PCR, ve které je extrahovaná DNA amplifikována primery specifickými pro lidskou DNA a potom rozdělena na gelové elektroforéze. Výsledek určíme jednoduše přítomností nebo absencí viditelného proužku. U zvířat jako šimpanz, gorila, makak japonský či makak jávský se proužek nevyskytoval. To znamená, že vzorky s proužkem navíc můžeme považovat za lidského původu. (Matsuda *et al.* 2005, Rapley a Whitehouse 2007)



Obr. 4. M – marker, sloupek 1 – člověk, 2 – šimpanz, 3 – gorila, 4 – makak japonský, 5 – makak jávský, 6 – prase, 7 – kráva, 8 – pes, 9 – koza, 10 – kuře, 11 – krysa, 12 – tuňák, Rapley a Whitehouse 2007

5. Analýza mtDNA

5.1 Historie sekvenování mtDNA

Lidská mtDNA byla poprvé sekvenována v roce 1981 v laboratoři Frederika Sangera v Cambridge (Anderson *et al.* 1981). Po mnoho let, byla tato první „Andersonova“ sekvence jediná, se kterou byly porovnávány další nově vzniklé. Andersonova sekvence je také známá jako Cambridge Reference Sequence (CRS). Většina laboratoří porovnává svoje výsledky s L-strand CRS. V roce 1999 byl originální materiál, použitý k sekvenování Andersonovy sekvence znovu osekvenován (Andrews *et al.* 1999). Některé původní chyby byly opraveny. Naštěstí nebyly objeveny výrazné chyby v segmentech HVI a HVII.

Nové výsledky z Cambridge (rCRS) jsou dnes používány jako standard pro porovnávání stanovených sekvencí (viz tab. 2., Andrews *et al.* 1999).

Celá opravená sekvence je dostupná na webových stránkách MITOMAP: <http://mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/HumanMitoSeq>, nebo pod novým číslem NC_012920 v GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/251831106>.

Sedm nukleotidů (či sekvence) bylo ponecháno v jejich nerevidované formě, přestože se vyskytují poměrně vzácně: 263A, 311C315C, 750A, 1438A, 4769A, 8860A, a 15326A. Dvanáct nukleotidů z originální CRS bylo opraveno: 3107del*, 3423T, 4985A, 9559C, 11335C, 13702C, 14199T, 14272C, 14365C, 14368C, 14766

Nukleotid 3107del* je delece označená v sekvenci jako N. Celkový počet nukleotidů je tedy o jeden menší než v původní CRS – 16568.

Tabulka 2. shrnující chyby v původní CRS.

Andrews et al. 1999

Table 1 • Reanalysis of the Cambridge reference sequence

Nucleotide position	Previous sequence	Reanalysed sequence	Remarks
263	A	A	rare polymorphism
311–315	CCCCC	CCCCC	rare polymorphism
750	A	A	rare polymorphism
1,438	A	A	rare polymorphism
3,106–3,107	CC	C	error
3,423	G	T	error
4,769	A	A	rare polymorphism
4,985	G	A	error
8,860	A	A	rare polymorphism
9,559	G	C	error
11,335	T	C	error
13,702	G	C	error
14,199	G	T	error
14,272	G	C	error (bovine)
14,365	G	C	error (bovine)
14,368	G	C	error
14,766	T	C	error (HeLa)
15,326	A	A	rare polymorphism

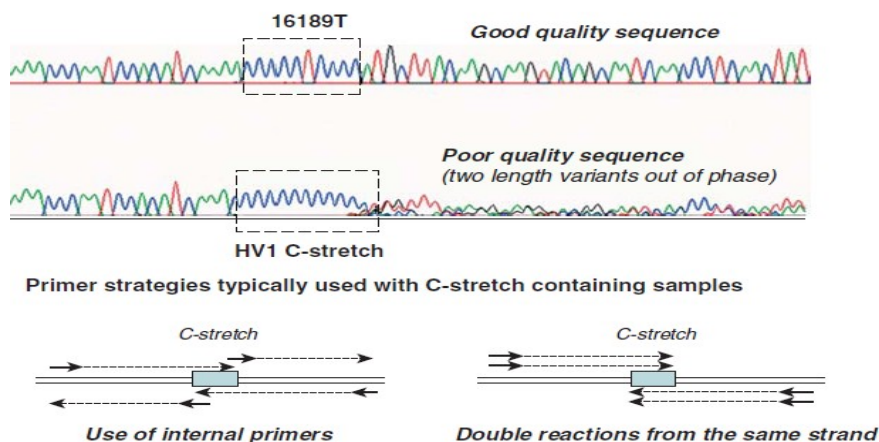
5.2 Interpretace výsledků

Vytváření profilu mtDNA začíná extrakcí celé mitochondriální DNA a pokračuje PCR amplifikací HV1 a HV2 úseků. Produkty amplifikace jsou potom čištěny, aby se zbavily primerů a dále sekvenovány použitím automatického sekvenátoru a kapilární elektroforézy. Poté může dojít k porovnávání referenčního a důkazního vzorku. Pokud je vzorek jednoznačně odlišný od vzorku referenčního, můžeme vyloučit, že pocházejí od jednoho jedince nebo ze stejné maternální linie. Pokud se vzorky shodují ve stejné heteroplasmii, může to zvýšit sílu shody. Ovšem když se heteroplazmie objeví jen v neznámém vzorku, neznamená to, že ho můžeme hned vyloučit. Pokud se vzorky liší v jednom nukleotidu, a nejedná se o heteroplazmii, je výsledek většinou považován za neprůkazný. Nicméně někdy mohou být vzorky stejného původu nebo stejné maternální linie, i když se liší v jednom nukleotidu, například pocházejí-li vzorky z různých tkání stejného jedince.

5.2.1 C-úseky

Potíže v interpretaci výsledků mohou přinést i tzv. C-úseky. V oblasti HV1 se nachází v pozici mezi 16 184 a 16 193 sekvence ...CCCCCTCCCC...Podobný úsek bohatý na cytosiny se vyskytuje i v oblasti HV2 mezi nukleotidy 303 až 315. Zde poměrně často dochází k tranzici z T na C a nelze uspokojivě určit sekvenci za těmito C-úseky z důvodu posunu čtecího rámce. Pokud tedy zjistíme přítomnost takového C-úseku, musíme použít

jiných primerů (Rasmussen *et al.* 2002), nebo můžeme stejné vlákno analyzovat ve dvou sekvenačních reakcích, abychom zbytek sekvence pokryli dvakrát, viz obr. 5 (Butler 2005).



Obr 5. Butler, Forensic DNA Typing 2005

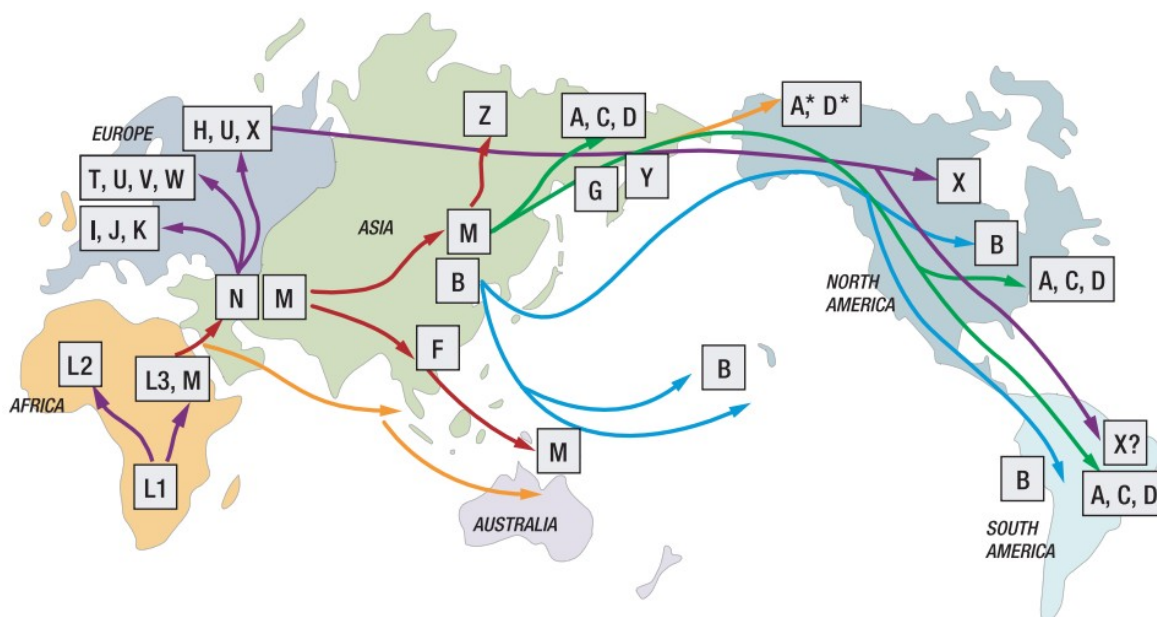
6. Populační databáze

Výsledky analýzy neznámé mtDNA nám jsou nejvíce užitečné, pokud je můžeme porovnat se vzorkem známým nebo s populační databází. Velikost a kvalita informací v databázi jsou velmi důležité. Zvláště u mtDNA je potřeba mít k dispozici z důvodu malé rekombinace velké databáze. Zatím největší databáze (složená z více malých) obsahující sekvence z oblastí HV1 a HV2 zahrnuje vzorky mtDNA 14 138 jednotlivců (Röhl *et al.* 2001). Pokud je k dispozici tak velká databáze, můžeme vytvořit i geografickou mapu mtDNA, která nám pak přiblíží, odkud geograficky pochází zdroj neznámé mtDNA.

Když se dva vzorky shodují nebo shodu nemůžeme vyloučit, je potřeba vytvořit statistický odhad náhodné shody. To znamená, že vypočítáme, s jakou pravděpodobností se náš vzorek bude shodovat s jiným náhodně vybraným. V praxi to představuje spočítání kolikrát je konkrétní haplotyp (sekvence) nalezen v databázi (Budowle *et al.* 1999). Tento přístup je zcela závislý na počtu vzorků přítomných v databázi. To znamená, že čím větší budeme mít databázi, tím lepší a kvalitnější bude statistický výpočet frekvence. Ovšem populační frekvence pro většinu typů DNA (kolem 60 %) nejsou dosud známy, protože se v databázích objevují jen jednou. Dnes je frekvence typů mtDNA v populaci vyčíslena jako součet výskytu v sekvenční databázi. MtDNA je populačně nebo rasově vázaná, a tak nám může přiblížit geografický původ pachatele. Proto je užitečné mít dostupnou takovou databázi.

Určení vztahů mezi lidskými mtDNA haplotypy a haploskupinami poskytuje více informací a strukturu lidské genetické variability. Haplotyp je specifická sekvence ze vzorku populace. Haploskupina je pak skupina haplotypů, které mají společné znaky, takže je zřejmé, že mají i společný původ. K určení hlavních haploskupin se používají různé fylogenetické metody. Jednou z těchto metod je například tvorba fylogenetických stromů mtDNA, díky kterým se mohlo například určit, kdy se lidé, respektive ženy dostali z Afriky na další kontinenty (Wallace *et al.* 1999).

Evropskou populaci můžeme v naprosté většině rozdělit do devíti hlavních haploskupin: H, I, J, K, T, U, V, W a X. Haploskupina H je nejčastějším mtDNA typem, který



Obr. 6. Haploskupiny a jejich rozšíření na kontinentech, www.mitosearch.org

se vyskytuje v 45,7 %. Další časté skupiny jsou U (15,6 %), T (10,5 %), J (10,0 %), a K (8,9 %). Asiáté jsou pak většinou spojeni s haploskupinami A, B, C, D, E, F, G a M, zatímco původní Američané patří do skupin A, B, C a D. Haploskupiny L1, L2 a L3 jsou africké (Wallace *et al.* 1999, Budowle *et al.* 2003). Díky zmapování těchto skupin na celém světě, můžeme také doložit migraci člověka na jednotlivé kontinenty i přibližnou dobu, kdy probíhala (viz. obr. č. 6.).

6.1 Populační databáze ve světě

FBI sestavila populační mtDNA databázi známou jako – The mtDNA Population Database nebo také CODIS^{mt} (COmbined DNA Index System – mitochondrial DNA). V současné době FBI používá k odhadu relativní četnosti haplotypu v populaci SWGDAM

databázi (Scientific Working Group of DNA Analysis Methods). Pro přehlednou klasifikaci jednotlivých mtDNA profilů byl ke každému profilu přiřazen 14 místný identifikační kód. První tři znaky reprezentují zemi původu, další tři etnickou skupinu (např. CAU = Caucasian – běloši, AFR – Afričané, ASN – Asiaté apod.) a posledních šest znaků představuje pořadí dané sekvence v databázi. Například pro první profil z České republiky by tento kód byl: CZE.CAU.000001. (Miller a Budowle 2001)

V Evropě se na rozvoji souhrnné populační databáze podílí zejména ISFG neboli Mezinárodní společnost pro forenzní genetiku. ISFG je organizace, ve které spolupracuje několik výzkumných skupin z celého světa včetně evropské – EDNAP, která se zabývá například právě vytvářením kvalitní mitochondriální databáze EMPOP (EDNAP mtDNA Population Database). Již čtvrtá verze projektu EMPOP je dostupná na stránkách <http://www.empop.org>, (Parson a Dür 2007).

Pokud někdo chce publikovat své výsledky založené na populační databázi mtDNA v časopise *Forensic Science International: Genetics*, musí se řídit několika předepsanými pravidly, které určili nejen recenzenti časopisu, ale také právě organizace ISFG (Carracedo *et al.* 2010). Tato pravidla představují určitou kontrolu kvality pro publikování získaných dat. Před tím, než autoři zašlou své výsledky do redakce časopisu, jsou povinni je poslat přímo pracovníkům EMPOP. Po vyhodnocení těchto dat kontaktuje EMPOP autora a přidělí jeho mtDNA sekvencím speciální čísla v EMPOP. Ta slouží jako kontrola kvality populačních dat pro redaktory při přezkumném řízení. Dále by se podle těchto pravidel autoři neměli zabývat pouze sekvencemi v oblastech HV1 a HV2, ale celou kontrolní oblastí (ovšem všechna populační data, která se mi podařila najít, jsou zatím opravdu pouze z některých úseků kontrolní oblasti). V souladu s dřívějšími doporučeními je minimální požadavek na přijetí údajů stanovit sekvence z obou vláken. Autoři EMPOP dále doporučují provádět amplifikaci pro obě oblasti najednou, čímž můžeme předejít možné záměně oblastí HVI a HVII u různých vzorků (Parson a Dür 2007).

Projekt EMPOP obsahuje celkem 12 875 haplotypů. Můžeme ho využít, zejména pokud chceme u konkrétního haplotypu zjistit, kolikrát se vyskytuje v jiných Evropských databázích či ve světě a jak moc unikátní tedy je. Pokud chceme naše data přidat do databáze EMPOP, musíme je nejprve publikovat a postupovat tak, jak je uvedeno výše. Bohužel EMPOP dosud neobsahuje žádná česká populační data.

Skvělým pomocníkem při vytváření, analýze a uchování vlastní populační databáze je internetový program a databáze mtDNAmanager (<http://mtmanager.yonsei.ac.kr/>, Lee *et al.* 2008). Pomocí tohoto programu můžeme podle mutací zařadit jednotlivé vzorky do

haploskupin, a také je porovnat s jinými populačními databázemi. V současné době je celkový počet sekvencí v tomto programu 9 294.

6.2 Populační databáze v České republice

V České republice se za posledních deset let problémem variability D-smyčky zabývali např. T. Vaněček a kolektiv. Studie Vaněčka byla provedena na 93 nepříbuzných jedincích. Po porovnání výsledků sekvencí kompletní D-smyčky, bylo nalezeno 85 haplotypů (91,4 %). Z toho 78 sekvencí (83,9 %) bylo v České populaci pozorováno pouze jednou, 6 bylo pozorováno dvakrát (12,9 %) a 1 byl pozorován třikrát (3,2 %). Tyto výsledky byly mírně odlišné od výsledků německé databáze, kde 95 % byly odlišné haplotypy a 93 % unikátní sekvence (Lutz *et al.* 1998). Nejpočetnější haplotyp (16519C, 263G, 315.1C) v porovnání s Andersonovou sekvencí byl pozorován u 3,2 % vzorků, což je typický haplotyp shledaný v různých evropských databázích. V oblastech HV1 a 2, byl pozorován typ 263G, 315.1C v 4,3 % případech, což je podobné i u jiných bělošských populací. Stupeň polymorfismu v České populaci v každé oblasti i celé D-loop se podle těchto výsledků neliší od ostatních evropských bělochů jako např. Francouzů, Britů, Němců apod. (Vaněček *et al.* 2004).

K podobným výsledkům došli i Vindrová a kolektiv, kteří publikovali databázi mitochondriální DNA 300 jedinců. Nejčastější haploskupiny v této databázi jsou H (41 %), U (21 %), dále také J a T. Frekvence jednotlivých haplotypů jsou velmi podobné výsledkům v Evropě, hlavně těm v Polsku, Německu a Rusku. Naopak ve srovnání s Finskou, Bulharskou nebo Tureckou databází můžeme najít významné rozdíly (Vindrová *et al.* 2008).

Jiná studie z České republiky se zabývá mitochondriální variabilitou v souvislosti s dalšími slovanskými národnostmi a jejich společnou historií (Malyarchuk *et al.* 2006). Česká populační databáze byla srovnána s databázemi z Bulharska, Ruska, Ukrajiny, Finska, Estonska, Běloruska, Polska, Bosny a Hercegoviny, Slovenska, Chorvatska, Srbska, a Makedonie. Česká databáze mtDNA obsahuje typické západní euroasijské haploskupiny H, pre-V, HV*, J, T, U, N1, W, a X. To více či méně koreluje s výsledky všech ostatních sledovaných národností s výjimkou severovýchodních států (Estonsko, Finsko). Analýza těchto dat prokázala to, že různé slovanské národnosti obsahují sice malé, ale určité množství asijské i baltské mitochondriální linie. Otázkou však zůstává, zdali je to způsobeno tím, že mají společného předka, či imigrací asijských nomádů zejména ve středověku. Nicméně archeologové objevili mnoho pozůstatků po kočovném kmeni Avarů tureckého původu, který ovládl v 6. – 9. století celou Karpatskou kotlinu i slovanské obyvatelstvo, které zde žilo.

Od té doby můžeme najít ve své DNA naše předky i mezi těmito vzdálenými kulturami. To dokazuje, jak může být mitochondriální DNA také v tomto směru přínosná. Jistě bychom se díky klasické genealogii přes nejlepší možné zdroje a matriky tak daleko do historie podívat nemohli. V dnešní době dokonce poskytují různé komerční laboratoře možnost takzvané genetické genealogie, kde si můžeme nechat vytvořit přímo podle naší mitochondriální DNA, či chromozomu Y jistě zajímavou genealogickou mapu.

7. Vlastní práce – analýza mtDNA a vytvoření populační databáze

7.1 Materiály a metodika

K vytvoření vlastní populační databáze mitochondriální DNA jsme měli k dispozici 138 vzorků nepříbuzných jedinců. Po provedení bukalního stěru byla mtDNA extrahována metodou adsorpce na silikátovou membránu pomocí QIAamp DNA Mini Kitu (Qiagen), (Greenspoon *et al.* 1998). K amplifikaci HV1 segmentu jsme použili primery A1, B0 a C1, D1 (sekvence primerů v tabulce 2.). PCR probíhala v cyklu LightCycler 480 (Roche) s použitím Power SYBR Green PCR mastermixu (Applied Biosystems). Produkty PCR byly potom čištěny od primerů látkou ExoSAP-IT (USB), která obsahuje dva potřebné hydrolytické enzymy – exonukleázu I a alkalickou fosfatázu. Exonukleáza I degraduje primery a všechny nepatřičné jednovláknové zbytky DNA, které vznikly při amplifikaci, a alkalická fosfatáza defosforyluje zbývající dNTP z PCR směsi. Poté jsme provedli dvě sekvenační reakce opět s primery A1, B0 a C1, D1 a použili sekvenační kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Produkt jsme opět přečistili od primerů (Big Dye XTerminator Purification Kit, Applied Biosystems). Sekvence byly poté přímo detekovány na genetickém analyzátoru 3130xl (ABI PRISM) v oblastech HV1 – od 16024 do 16324 nukleotidu a HV2 – 57 až 372. Získaná data jsme analyzovali v programu SeqScape (Applied Biosystems) a porovnali s rCRS. Populační data jsme analyzovali v programu mtDNAMAN (<http://mtmanager.yonsei.ac.kr/>, Lee *et al.* 2008).

Tabulka 3. MtDNA amplifikační/sekvenační primery:

primer	sekvence
A1	5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3'
B0	5'-CACCATCCTCCGTGAAATCA -3'
C1	5'-CTCACGGGAGCTCTCCATGC-3'
D1	5-GGCGGTATGCACTTTTAACAG-3'

7.2 Výsledky

Po porovnání výsledků s rCRS jsme mohli v úsecích HV1 a HV2 určit 122 různých haplotypů. Z toho 110 haplotypů (79,7 %) bylo v naší databázi pouze jednou, 10 haplotypů bylo pozorováno dvakrát, jeden haplotyp třikrát a dva čtyřikrát. Celkově se mutace vyskytly na 118 různých pozicích sekvence. U jednotlivých haplotypů jsme dále prostřednictvím programu mtDNAMANAGER mohli určit příslušné haploskupiny, výskyt v západoevropské části databáze, která obsahuje sekvence 3673 jedinců včetně vzorků FBI (tedy i bělošské populace USA), a také příslušné pravděpodobnosti shody. Jeden z nejčastějších haplotypů v naší databázi však překvapivě patří do haploskupiny M, která geograficky pochází z východní Asie. Možným vysvětlením je, že mezi testovanými osobami byly také příslušníci romské menšiny.

Četnosti jednotlivých haplotypů jsou velmi podobné těm ve střední, západní i východní Evropě. 40 % haplotypů v naší databázi patří do skupiny H, dále také do U, J, a T, což jsou u nás i v Evropě nejčastěji sledované haploskupiny. Mezi těmito obvyklými typy se však nachází již zmíněné množství zastoupení východní linie – haploskupiny A a M, a to v 3,6 %. V následující tabulce je uveden přehled výsledků (viz tabulka č. 3.).

*Tabulka 3. **hp.** – haploskupina, **N** – výskyt v naší databázi, **WE** – výskyt v západoevropské části databáze mtDNAMANAGER, **%** – výskyt v západoevropské části databáze mtDNAMANAGER v %, **p.s.** – pravděpodobnost shody*

HV1	HV2	hp.	N	WE	%	p.s.
CRS	263 309.1C 315.1C	H	4	108	2.94	0.043
16129 16223 16291 16298	73 263 309.1C 315.1C	M5a1	4	51	2.94	0.043
16129 16223 16291 16298	263 309.1C 315.1C	HV0*	3	0	0	0.036
16069 16126	73 185 228 263 295	J1c	2	27	0.74	0.029
16069 16126	73 185 228 263 295 315.1C	J1c	2	27	0.74	0.029
16069 16126	73 185 188 228 263 295 315.1C	J1c2	2	15	0.4	0.029
16126 16163 16186 16189 16294	73 152 195 263 309.1C 315.1C	T1a	2	24	0.64	0.029
16129 16172 16223 16311	73 199 203 204 250 263 315.1C	I1a	2	9	0.25	0.029
16129 16172 16223 16311 16391	73 199 203 204 250 263 315.1C	I1a	2	9	0.25	0.029
16298	72 263 309.1C 315.1C	HV0*	2	27	0.74	0.029

16298	263	309.1C	315.1C		HV0*	2	27	0.74	0.029	
16298	263	309.1C	309.2C	315.1C	HV0*	2	2	0.05	0.029	
16362	239	263	309.1C	309.2C	315.1C	H6	2	16	0.43	0.029
16041 16209	263	315.1C			H	1	0	0	0.021	
16048 16129 16224 16311	189	263	309.1C	315.1C	K1a10	1	0	0	0.021	
16051 16092 16129 16182 16183 16189	CRS				H	1	0	0	0.021	
16051 16129 16189 16192 16256	73	152	217	263	315.1C	U5a	1	0	0	0.021
		340								
16051 16129 16189 16256	73	152	217	263	315.1C	U2	1	0	0	0.021
		340								
16051 16162	73	263	309.1C	315.1C	H1a	1	4	0.1	0.021	
16069 16126 16193 16278	73	150	263	295	309.1C	J2b	1	3	0.08	0.021
		315.1C								
16069 16092 16126 16145 16172 16222 16261	73	146	242	263	295	J1b1	1	0	0	0.021
		315.1C								
16069 16126 16145 16172 16222 16261	242	263	295	315.1C	327	J1b1	1	0	0	0.021
16069 16126 16145 16222 16235 16261 16271	73	263	295	309.1C	315.1C	J1b3	1	0	0	0.021
		315.1C								
16069 16126 16189 16245	73	185	228	263	295	J1c	1	0	0	0.021
		309.1C	315.1C							
16069 16126 16189 16193 16245	73	185	228	263	295	J1c	1	0	0	0.021
		315.1C								
16069 16126 16145 16222 16235 16261 16271	263	295	309.1C	315.1C		J1b3	1	0	0	0.021
16069 16092 16126 16261	73	146	185	228	263	J1c7	1	1	0.03	0.021
		295	315.1C							
16069 16126	185	188	228	263	295	J1c2	1	0	0	0.021
		315.1C								
16074 16189 16270	73	150	242	263	315.1C	U5b1b	1	0	0	0.021
16092 16169 16293 16311	195	263	315.1C			H11a	1	1	0.03	0.021
16093 16221	263	309.1C	315.1C			HV4a	1	3	0.08	0.021
16093 16223	73	152	189	194	195	W	1	0	0	0.021
	204	207	239	263	315.1C					
16093	263	315.1C				H	1	1	0.03	0.021
16104 16126 16294 16304	73	152	263	315.1C		T2b	1	1	0.03	0.021
16111 16249 16327 16362	73	146	263	285	315.1C	U1b	1	0	0	0.021
16114 16301 16344	263	315.1C				H10a	1	0	0	0.021
16126 16163 16186 16189 16294	152	195	263	309.1C	309.2C	T1a	1	0	0	0.021
		315.1C								
16126 16294 16296 16304	73	263	315.1C			T2b	1	21	0.57	0.021
16126 16239 16294 16296 16304	263	309.1C	309.2C	315.1C		T2b	1	0	0	0.021
16126 16163 16186 16189 16294	73	152	195	263	315.1C	T1a	1	8	0.22	0.021
16126 16193 16278	73	150	263	295	309.1C	J2b	1	0	0	0.021

	315.1C									
16126 16292 16294	73	146	152	263	279	T2c	1	1	0.03	0.021
	309.1C 315.1C									
16126 16182 16183 16189 16294 16296 16298	195	263	309.1C	309.2C	315.1C	T2f	1	0	0	0.021
16126 16294 16296 16304	73	263	309.1C	315.1C		T2b	1	21	0.57	0.021
16126	185	263				H	1	0	0	0.021
16126 16193	73	150	152	263	295	J2b	1	0	0	0.021
	309.1C									
16129 16223 16391	73	152	199	204	207	I2	1	5	0.14	0.021
	250	263	309.1C	315.1C						
16129 16172 16223	73	199	203	204	250	I1a	1	0	0	0.021
	263									
16129 16223 16291 16298 16368	73	234	263	309.1C	315.1C	M5a1	1	0	0	0.021
16129	263	309.1C	315.1C			H	1	7	0.19	0.021
16129 16172 16223 16311 16391	73	199	203	204	250	I1a	1	2	0.05	0.021
	263	309.1C	315.1C							
16129 16223 16311	CRS					M10*	1	0	0	0.021
16129 16223 16271	73	263	309.1C	315.1C		-	1	0	0	0.021
16136 16176 16278 16356	73	195	263	309.1C	315.1C	U4b2	1	0	0	0.021
16144 16189 16270	73	150	263	309.1C	315.1C	U5b1b1	1	2	0.05	0.021
16147 16183 16189 16270	150	263	309.1C	309.2C	315.1C	U5b1b	1	0	0	0.021
16153 16223 16290 16311 16319	146	152	199	235	263	A	1	0	0	0.021
	309.1C 315.1C									
16153 16298	72	93	263	309.1C	315.1C	HV0	1	2	0.05	0.021
16158	263	315.1C				H	1	1	0.03	0.021
16162 16298	263	309.1C	309.2C	315.1C		HV0*	1	1	0.03	0.021
16171 16192 16256 16266 16270 16291	73	257	263	315.1C		U5a	1	0	0	0.021
16176	195	263	315.1C			H	1	2	0.05	0.021
16188	263	315.1C				H	1	2	0.05	0.021
16188	263	309.1C	309.2C	315.1C		H	1	2	0.05	0.021
16188	263	309.1C	315.1C			H	1	2	0.05	0.021
16189 16223 16278 16316	73	195	263	315.1C		X2	1	0	0	0.021
16189 16356	263	315.1C				H1b	1	5	0.14	0.021
16189 16223 16278 16357	73	153	195	225	226	X2b	1	0	0	0.021
	263	309.1C	315.1C							
16189 16356	152	263	309.1C	315.1C		H1b	1	1	0.03	0.021
16189 16192 16256 16270 16291	73	263	315.1C			U5a	1	0	0	0.021
16189 16192 16270	150	263	315.1C			U5b1b	1	0	0	0.021
16189 16356 16362	93	263	315.1C			H1b	1	0	0	0.021
16189 16192 16256 16270 16311 16362	73	151	152	263	309.1C	U5a	1	0	0	0.021
16189 16270	73	150	152	263	315.1C	U5b1b	1	1	0.03	0.021
16189	263	309.1C	309.2C	315.1C		H	1	8	0.22	0.021

16192 16256 16270	73 263 309.1C 315.1C	U5a	1	0	0	0.021
16192 16256 16270 16291	73 263 315.1C	U5a	1	8	0.22	0.021
16192	73 152 200 263 315.1C	H	1	0	0	0.021
16207	228 263 309.1C 315.1C	H	1	1	0.03	0.021
16209 16304	73 263 315.1C	M17c	1	0	0	0.021
16213 16304	263 309.1C 309.2C 315.1C	H5	1	0	0	0.021
16213 16304	152 263 309.1C 309.2C 315.1C	H5	1	0	0	0.021
16223 16292 16362	73 189 194 195 199 204 207 263 309.1C 315.1C	W5a	1	0	0	0.021
16224	73 146 150 152 263 309.1C	K2a	1	0	0	0.021
16233 16256 16311 16343	73 150 263 309.1C 315.1C	U3	1	0	0	0.021
16245	152 263 315.1C	H	1	0	0	0.021
16249 16362	239 263 309.1C 315.1C	H6	1	0	0	0.021
16256	263 309.1C 309.2C 315.1C	H	1	2	0.05	0.021
16258 16270 16292 16311 16362	73 150 195 263 309.1C 315.1C	U5b	1	0	0	0.021
16261 16291 16311	200 263 309.1C 309.2C 315.1C	H	1	2	0.05	0.021
16265	263 309.1C 315.1C	H	1	1	0.03	0.021
16266 16320	263 309.1C 315.1C	H	1	0	0	0.021
16271	195 257 263 309 309.1C 309.2C 315.1C	H	1	0	0	0.021
16278	263 309.1C 309.2C 315.1C	H	1	2	0.05	0.021
16278 16293 16311	195 263 315.1C	H11a	1	3		0.021
16294 16304	263 315.1C	T2b	1	4		0.021
16298	72 195 263 309.1C 309.2C 315.1C	HV0	1	2	0.05	0.021
16298 16300	72 73 263 309.1C 315.1C	—	1	0	0	0.021
16298 16311	195 263 309.1C 309.2C 315.1C	H11	1	0	0	0.021
16298 16356	73 152 195 215 263 315.1C	U4	1	0	0	0.021
16304	263 309.1C 315.1C	H5	1	13	0.35	0.021
16304	152 263 309.1C 315.1C	H5	1	5	0.14	0.021
16304 16311	263 309.1C 315.1C	H5	1	1	0.03	0.021
16309	263 309.1C 315.1C	H	1	0	0	0.021
16311	144 195 263 309.1C 309.2C 315.1C	H11	1	0	0	0.021
16327	263 315.1C	H	1	1	0.03	0.021
16343	73 150 263 315.1C	U3	1	8	0.22	0.021
16343	73 150 263	U3	1	0	0	0.021
16343 16390	73 150 263 309.1C 315.1C	U3a	1	9	0.24	0.021
16356	73 195 215 263 309.1C 315.1C	U4	1	0	0	0.021
16356	73 146 195 228 263 315.1C	U4b1	1	1	0.03	0.021

16362	239	263	288	315.1C	H6	1	0	0	0.021
CRS	195	263	310		U4a2	1	0	0	0.021
		315.1C			H	1	8	0.22	0.021
CRS	152	263	309.1C	315.1C	H	1	15	0.41	0.021
CRS	73	150	263	309.1C 315.1C	—	1	0	0	0.021
CRS	73	263	315.1C		—	1	10	0.26	0.021
CRS	239	263	309.1C	315.1C	H	1	0	0	0.021
CRS	263	315.1C			H	1	118	3.21	0.021
CRS	182	263	309.1C	309.2C 315.1C	H	1	0	0	0.021
CRS	146	263	309.1C	315.1C	H	1	23	0.63	0.021
CRS	263				H	1	0	0	0.021
CRS	72	151	195	263 309.1C	HV0	1	0	0	0.021
			309.2C						

8. Závěr

V dnešní době nás média stále častěji informují o teroristických útocích, hromadných neštěstích a přírodních katastrofách či násilných činech, při kterých zemrou tisíce lidí. K identifikaci ostatků v mnoha případech nelze využít klasický postup analýzy DNA, jelikož ta je většinou již silně nebo úplně degradována. V těchto případech nám může dobře posloužit výjimečně odolná mitochondriální DNA, která se v našich buňkách nachází v mnoha kopiích a navíc je identická s maternálními příbuznými, kteří mohou posloužit pro srovnání.

Abychom však mohli s určitou jistotou potvrdit původ konkrétního vzorku, potřebujeme k tomu co největší populační databázi. Ve světě jich už existuje mnoho a dále se postupně rozšiřují. Je ovšem otázkou, jak moc tyto databáze můžeme využít u nás ve střední Evropě či přímo v České republice, kde se samozřejmě může zastoupení jednotlivých haplotypů lišit. V ČR totiž stále chybí ucelená jednotná databáze mtDNA, proto by mělo být naší snahou nejen získávání nových dat a jejich zařazení, ale také publikování této problematiky v odborných časopisech a spolupráce s jinými laboratořemi a organizacemi, aby se i naše sekvence umístili např. v celosvětových databázích typu EMPOP.

Pokud se tyto databáze budou nadále rozšiřovat, můžeme pak v dané populaci zmapovat jednotlivé národnostní menšiny nebo přiblížit geografický původ konkrétního člověka, což může přímo pomoci kriminalistům zrychlit a zefektivnit hledání podezřelých osob či pohřešovaných. Eventuálně se v budoucnu naskytá možnost, že by analýza DNA vedla nejen k pravděpodobnému profilu podezřelého či oběti po stránce genetické, ale přímo k vnější podobě dané osoby.

Závěrem bych ráda uvedla, že mou budoucí snahou je pokusit se publikovat průběh a výsledky našeho výzkumu v některém z odborných časopisů a vzbudit tak zájem o problematiku tvorby mtDNA databází i u nás v České republice.

9. Seznam použitých zkratk

zkratka	anglický název	český význam
MtDNA	mitochondrial DNA	mitochondriální DNA
PCR	Polymerase Chain Reaction	polymerázová řetězová reakce
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat	variabilní počet tandemových repetice
FBI	Federal Bureau of Investigation	federální úřad pro vyšetřování
SWGDM	Scientific Working Group on DNA Analysis Methods	vědecká pracovní skupina v oblasti DNA analytických metod
EDNAP	The European DNA Profiling Group	Evropská DNA vědecká skupina
STR	Short tandem repeat	krátké tandemové repetice
SNP	Single nukleotid polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
EMPOP	EDNAP mtDNA Population Database	EDNAP mtDNA populační databáze
cyt b	cytochrom b	cytochrom b
ISFG	International society for forensic genetics	Mezinárodní společnost pro forenzní genetiku

10. Použitá literatura:

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., Young, I.G. (1981), Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 290: 457–465.

Andréasson H., Nilsson, M., Budowle, B., Frisk, S., Allen, M. (2006), Quantification of mtDNA mixtures in forensic evidence material using pyrosequencing, *Legal Medicine*, 120: 383–390.

Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., Howell, N.(1999), Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA, *Nature–Genetics*, 23, 147.

Budowle, B., Wilson M.R., DiZinno J.A., Stauffer C., Fasano, M.A., Holland, M.M., Monson, K.L. (1999), Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data, *Forensic Science International*, 103:23–35.

Budowle, B., Allard, M.W., Wilson, M.R., Chakraborty, R. (2003), Forensic and mitochondrial DNA: application, debates, and foundations, *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 4: 119–141.

Butler, J.M. (2005), Forensic DNA Typing: *Biology, Technology and Genetics of STR Markers*, Elsevier Academic Press, Burlington.

Carracedo, A., Butler, J.M. Gusmão, L., Parson, W., Roewer, L., Schneider, P.M. (2010), Publication of population data for forensic purposes, *Forensic Science International – Genetics*, 145–147.

Comas, D., Paabo, S., Betranpetit, J. (1995), Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA, *Genome Research*, 5(1): 89–90.

Embley, T.M., Martin, W. (2006), Eukaryotic evolution, changes and challenges, *Nature*, 440: 623–630.

Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., Wallace, D.C. (1980), Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 77: 6715–6719.

Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F. (1999), Mitochondrial evolution, *Science*, 283: 1476–1481.

Greenspoon, S.A., Scarpetta, M.A., Drayton M.L., Turek, S.A. (1998), Qiaamp spin columns as a method of DNA isolation for forensic casework, *Journal for Forensic Sciences*, 43:1024–1030.

Hayashi, J., Takemitsu, M., Goto, Y., Nonaka, I. (1994), Human mitochondria and mitochondrial genome function as a single dynamic cellular unit, *Journal Cell Biology*, 125: 43–50.

Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. (1985), Hypervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA, *Nature*, 314 (6006): 67–73.

Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L., Weatherall, D.J., Ponder, B.A.J. (1986), DNA "Fingerprints" and Segregation Analysis of Multiple Markers in Human Pedigrees, *American Journal of Human Genetics*, 39:11–24.

Just, R.S., Loreille, O.M., Molto, J.E. , Merriwether, D.A., Woodward, S.R., Matheson, C., Creed, J., McGrath, S.E. Sturk-Andreaggi, K., Coble, M.D., Irwin, J.A., Ruffman, A., Parr, R.L. (2010), Titanic's unknown child: The critical role of the mitochondrial DNA coding region in a re-identification effort, *Forensic Science International – article in press* (available on www.sciencedirect.com – 5 pages.)

Kimpton, C.P., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E.S., Adams, M. (1993), Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci, *PCR Methods Applications*, 3: 13–22.

Krings, M., Stone, A., Schmitz, R.W., Krainitzki, H., Stoneking, M., Paabo, S. (1997), Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans, *Cell*, 90: 19–30.

Köchl, S., Niedestätter, H., Parson, W. (2005), DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR, *Methods in molecular biology*, 297: 13–30.

Lee, L.G., Spurgeon, S.L., Heiner, C.R., Benson, S.C., Rosenblum, B.B., Menchen, S.M., Graham, R.J., Constantinescu, A., Upadhy, K.G., Cassel, J.M. (1997), New energy transfer dyes for DNA sequencing, *Nucleic Acids Research*, 25: 2816–2822.

Lee, H.Y., Song, I., Ha, E., Cho, S.B., Yang, W. I., Shin, K.J. (2008), mtDNAMAN: a Web-based tool for the management and quality analysis of mitochondrial DNA control-region sequences, *BMC Bioinformatics*, 9: 483.

Malyarchuk, B.A., Vaněček, T., Perková, M.A., Derenko, M.V., Sip, M. (2006), Mitochondrial DNA variability in the Czech Population with the application of the ethnic history of Slavs, *Human biology*, 681–696.

Matsuda, H., Seo, Y., Kakizaki, E., Kozawa, S., Muraoka, E., Yukawa, N. (2005), Identification of DNA of human origin based on amplification of human-specific mitochondrial cytochrome b region, *Forensic Science International*, 152: 109–114.

Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G., Attardi, G. (1999), Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication, *Science*, 286: 774–779.

Miller, K. W. P., Budowle, B. (2001), A Compendium of Human Mitochondrial DNA Control Region: Development of an International Standard Forensic Database, *Croatian Medical Journal*, 42(3): 315–327.

MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>, 2011.

Morley, J.M., Bark, J.E., Evans, C. E., Perry, J. G., Hewitt, A., Tully G. (1999), Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework, *Legal medicine*, 112: 241–248.

Morling, N. (2009), PCR in forensic genetics, *Biochemical Society Transactions*, 37(2): 438–440.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S. *et al.* (1986), Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology*, 51(1): 263–273.

Pääbo S., Gifford, J.A., Wilson, A.C. (1988), Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain, *Nucleic Acids Research*, 9775–9787.

Parson, W., Dür, A., (2007), EMPOP – A forensic mtDNA database, *Forensic Science International: Genetics*, 1: 88–92.

Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M., Steinlechner, M. (2000), Species identification by means of the cytochrome *b* gene, *International Journal of Legal Medicine*. 114: 23–28.

Robin, E.D. a Wong, R. (1988), Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells, *Journal of Cell Physiology*, 136: 507–513.

Rapley, R., Whitehouse D. *et al.* (2007), Mitochondrial Analysis in Forensic Science, *Molecular Forencis*, John Wiley a Sons Ltd, Chichester, 128–138.

Rasmussen, E.M., Sorensen, E., Eriksen, B., Larsen, H.J., Morling, N. (2002), Sequencing strategy of mitochondrial HV1 and HV2 DNA with length heteroplasmy, *Forensic Science International*, 129, 209–213.

Relethford, J.H. (2003), Reflections of Our Past: How Human History is Revealed in Our Genes – reviewed by John Hawks, *Paleo-Anthropology*, 27–29.

Röhl, A., Brinkmann, B., Forster, L., Forster, P. (2001), An annotated mtDNA database, *International Journal of Legal Medicine*, 115, 29–39.

Sanger, F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5463–5467.

Sato, A., Nakada, K., Akimoto, M., Ishikawa, K., Ono, T., Shitara, H., Yonekawa, H., Hayashi, J. (2005), Rare creation of recombinant mtDNA haplotypes in mammalian tissues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102: 6057–6062.

Satoh, M. a Kuroiwa, T. (1991), Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell, *Experimental Cell Research*, 196: 137–140.

SWGDM (2003), Guidelines for mitochondrial DNA (mtDNA) nucleotide sequence interpretation. Forensic Science Communications,

dostupné na: <http://www2.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2003/swgdammitodna.htm>

Taanman, J.W. (1999), The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochemica et BiophysicaActa*, 1410: 103–123.

Titley, K.C., Pynn, B.R. Chernecky, R., Mayhall, J.T., Kulkarni, G.V., Ruffman, A. (2004), The Titanic disaster: Dentistry's role in the identification of an 'Unknown Child', *Journal of Canadian Dental Association*, 1:24–28.

Tully, L.A., Parsons, T.J., Steighner, R.J., Holland, M.M., Marino, M.A., Prenger, V.L. (2000), A Sensitive Denaturing Gradient–Gel Electrophoresis Assay Reveals a High Frequency of Heteroplasmy in Hypervariable Region 1 of the Human mtDNA Control Region, *American Journal of Human Genetics*, 67 :432–443.

Vaněček, T., Vorel, F., Šíp, M., (2004), Mitochondrial DNA D-loop hypervariable regions: Czech population data, *International Journal of Legal Medicine*, 118: 14–18.

Wallace, D.C., Brown, M.D., Lott, M.T. (1999), Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease, *Gene*, 238, 211–230.

Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. (1991), Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *BioTechniques*, 10: 506–513.

Internetové zdroje či odkazy:

www.mitosearch.org

<http://mtmanager.yonsei.ac.kr/>

<http://www.empop.org>.

<http://www.forensic.gov.uk/html/media/case-studies/f-18.html>).

<http://mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/HumanMitoSeq>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/251831106>